

Essais de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* applicables à l'environnement hydrique

In vitro and *in vivo* genotoxicity tests for studying contaminated aquatic environmental samples

E. Godet, B. Vasseur et M. Sabut

Volume 6, numéro 3, 1993

URI : <https://id.erudit.org/iderudit/705177ar>

DOI : <https://doi.org/10.7202/705177ar>

[Aller au sommaire du numéro](#)

Éditeur(s)

Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

ISSN

0992-7158 (imprimé)

1718-8598 (numérique)

[Découvrir la revue](#)

Citer cet article

Godet, E., Vasseur, B. & Sabut, M. (1993). Essais de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* applicables à l'environnement hydrique. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 6(3), 285–314. <https://doi.org/10.7202/705177ar>

Résumé de l'article

Cet article est une revue des essais *in vitro* et *in vivo* utilisés pour évaluer le caractère génotoxique des micropolluants des milieux environnementaux relatifs aux eaux continentales et marines, rejets liquides d'origine domestique, industrielle ou agricole, sédiments de rivières et boues de stations de traitement d'épuration.

Les essais *in vitro* réalisés sur cellules eucaryotes ou procaryotes sont fondés sur la détection des mutations géniques et chromosomiques, ou la mesure des adduits à l'ADN. Ils constituent des systèmes d'épreuve miniaturisés qui requièrent des volumes d'échantillons faibles; ils se prêtent ainsi au dépistage à grande échelle de la génotoxicité et à l'étude des concentrats et des extraits préparés à partir des milieux contaminés. Ils sont cependant moins bien adaptés à la prédiction de l'impact des micropolluants sur l'environnement.

La recherche de conditions d'essai plus proches de la réalité environnementale a conduit au développement des essais *in vivo* réalisés sur organismes supérieurs, mollusques, poissons ou amphibiens, qui évaluent un potentiel génotoxique à partir d'études cytogénétiques ou d'études du caryotype des organismes exposés.

Les critères de génotoxicité étudiés *in vitro* peuvent être utilisés dans le cadre d'études écoépidémiologiques, sur le terrain, afin d'évaluer l'impact réel des micropolluants présents dans les milieux environnementaux sujets à des contaminations d'origines diverses.

Essais de g notoxicit  *in vitro* et *in vivo* applicables   l'environnement hydrique

In vitro and *in vivo* genotoxicity tests for studying contaminated aquatic environmental samples

• •

F. GODET¹, P. VASSEUR^{1*} et M. BABUT²

Re u le 19 janvier 1993, accept  le 3 juin 1993. **

SUMMARY

This review deals with *in vitro* and *in vivo* genotoxicity bioassays carried out to evaluate the genotoxic potential of polluted environmental samples : continental and marine waters, domestic and industrial wastewaters, aquatic sediments and sludges of urban or industrial wastewater treatment plants.

The end-points of the *in vitro* and *in vivo* assays are : genetic alterations, i.e. reverse and forward mutations, DNA adducts or chromosomic damages, i.e. chromosomic aberrations (AC), micronuclei (MN) and sister chromatid exchanges (SCE).

The *in vitro* assays generally detect adverse effects on DNA only after concentration or extraction of micropollutants. They constitute miniaturized tools, rapid and easy to use, thus well-suited for large screening studies. *In vitro* genotoxicity bioassays requiring only small volumes of samples are therefore systems of choice for testing concentrates or extracts from environmental contaminated samples. Among the *in vitro* assays reviewed, the *Salmonella typhimurium* gene mutation test is the most often used to assess the genotoxic potential of contaminated samples. However, genotoxicity tests performed on eukaryotic cell cultures are more relevant than those using bacteria for evaluating environmental pollution. The use of fish cell lines appears superior to the use of mammalian cells for assessing an aquatic impact.

In vitro bioassays, whether performed on prokaryotic or eukaryotic cells, are limited for predicting the possible impact of genotoxic pollutants on the environment. It is clear that it is difficult to extrapolate *in vitro* bioassay

1. Laboratoire de toxicologie, Centre des Sciences de l'Environnement, BP 4025, 57040 Metz Cedex 1.
2. Agence de l'Eau Rhin-Meuse, BP 19, 57161 Moulins-les-Metz.

* Auteur auquel la correspondance peut  tre adress e.

** Les commentaires seront re us jusqu'au 31 mars 1994.

results to higher organisms in which the response obtained integrates effects of complex metabolizing systems, hormonal regulation and immunological defenses.

Therefore, genotoxicity studies performed with aquatic organisms such as molluscs (*Mytilus sp.*), fish (*Umbra pygmaea*, *Notobranchius rachowi*) or amphibians (*Pleurodeles waltl*) appear more representative of environmental conditions. The genotoxicity end-points of *in vivo* assays are mainly cytogenetic damage such as the SCE, AC or MN but also take into account DNA adducts. Direct testing of environmental samples without preconcentration is possible with *in vivo* assays. This means that factors such as bioavailability and metabolism will be integrated directly in the response of these assays. Hence, these *in vivo* assays are more sensitive than *in vitro* genotoxicity tests. However, *in vivo* tests require important volumes of sample and it will be difficult or almost impossible to apply them for testing concentrates or sample extracts, generally only available in small quantities. An interesting area of application of *in vivo* assays is field studies and ecoepidemiology. In this respect, they would constitute an *a posteriori* control system of pollution effects, assuming that suitable control areas are available to eliminate the influence of confounding factors.

As a general conclusion, it is important to emphasize the interest of using both *in vitro* and *in vivo* bioassays for evaluating the genotoxicity of contaminated environmental samples. This rationale is based on the fact that *in vitro* bioassays are well adapted for genotoxicity screening of concentrates and extracts testing, while *in vivo* tests are interesting because of their better representativity in terms of environmental conditions of exposure to pollutants.

Key-words : Genotoxicity, mutagenicity, aquatic contaminants, *in vivo* bioassays, *in vitro* bioassays, environmental samples.

RÉSUMÉ

Cet article est une revue des essais *in vitro* et *in vivo* utilisés pour évaluer le caractère génotoxique des micropolluants des milieux environnementaux relatifs aux eaux continentales et marines, rejets liquides d'origine domestique, industrielle ou agricole, sédiments de rivières et boues de stations de traitement d'épuration.

Les essais *in vitro* réalisés sur cellules eucaryotes ou procaryotes sont fondés sur la détection des mutations géniques et chromosomiques, ou la mesure des adduits à l'ADN. Ils constituent des systèmes d'épreuve miniaturisés qui requièrent des volumes d'échantillons faibles ; ils se prêtent ainsi au dépistage à grande échelle de la génotoxicité et à l'étude des concentrats et des extraits préparés à partir des milieux contaminés. Ils sont cependant moins bien adaptés à la prédiction de l'impact des micropolluants sur l'environnement.

La recherche de conditions d'essai plus proches de la réalité environnementale a conduit au développement des essais *in vivo* réalisés sur organismes supérieurs, mollusques, poissons ou amphibiens, qui évaluent un potentiel génotoxique à partir d'études cytogénétiques ou d'études du caryotype des organismes exposés.

Les critères de génotoxicité étudiés *in vitro* peuvent être utilisés dans le cadre d'études écoépidémiologiques, sur le terrain, afin d'évaluer l'impact réel des micropolluants présents dans les milieux environnementaux sujets à des contaminations d'origines diverses.

Mots clés : Génotoxicité, mutagénicité, contaminants hydriques, essais *in vivo*, essais *in vitro*, milieux environnementaux.

Abréviations

Composés chimiques

B(a)P	= benzo(a)pyrène ;
Bases Ar.	= bases aromatiques ;
MMC	= mitomycine C ;
CP	= cyclophosphéide ;
DMN	= diméthylnitrosamine ;
EMS	= éthylméthanesulfonate ;
HAP	= hydrocarbures aromatiques polycycliques ;
HC-al	= hydrocarbures aliphatiques ;
HM	= hydrazide maléique ;
MMS	= méthylméthanesulfonate ;
MNNG	= N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine ;
N-CAP	= composés aromatiques polycycliques azotés ;
OH-HAP	= hydrocarbures aromatiques polycycliques hydroxylés ;
S-CAP	= composés aromatiques polycycliques soufrés ;
Ox	= composés oxygénés ;
PCB	= polychlorobiphényles ;
PCP	= pentachlorophénol ;
TCHF	= trichlorohydroxyfuranone.

Essais

AC	= aberrations chromosomiques ;
HGPRT	= hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase ;
MN	= micronoyau ;
RO	= résistance à l'ouabaïne ;
SCE	= échanges de chromatides sœurs ;
SOS	= SOS chromostest ;
TC	= transformation cellulaire ;
UDS	= synthèse non programmée de l'ADN (« unscheduled DNA synthesis »).

Types cellulaires

BF ₂	= lignée cellulaire établie de perche soleil ;
CHO	= cellules ovariennes d'hamster chinois ;
Hpr	= hépatocytes primaires de rats ;
Lh	= lymphocytes humains ;
RTG ₂	= lignée cellulaire de gonades de truite arc-en-ciel.

Autres abréviations

Anaph. ab.	= anaphases aberrantes ;
Chrom	= chromosome ;
FC	= facteur de concentration ;
Lyoph	= lyophilisat ;
Métaph. ab.	= métaphases aberrantes ;
Rés	= résistant(e)s ;
Rév	= révertants ;
S9	= S9 mix, fraction métabolique microsomale de foie de rats ;
Souter.	= souterraine.

1 - INTRODUCTION

Le contrôle de la toxicité des micropolluants dans les milieux hydriques se limite encore actuellement à la seule évaluation de leur toxicité aiguë. L'impact à moyen et long terme des pollutions hydriques n'est pas étudié dans les contrôles de routine et reste encore du domaine de la recherche.

Depuis quelques années cependant, il s'est développé au sein de la communauté scientifique une réelle prise de conscience du risque génotoxique lié au rejet dans l'environnement de molécules chimiques au caractère mutagène et cancérogène. Cela s'est traduit par le développement d'études de génotoxicité des milieux environnementaux situés dans des zones « à risques » ou contaminées par des rejets d'origine industrielle ou agricole. Ces études ont permis de mettre en évidence et d'évaluer un risque génotoxique, et de déterminer les méthodes et les essais à mettre en œuvre pour le quantifier.

Les essais utilisés dans un premier temps ont été ceux développés pour l'évaluation du potentiel génotoxique des substances chimiques : ces essais *in vitro*, sensibles et relativement faciles à mettre en œuvre, ont d'abord été appliqués à une fraction concentrée des micropolluants, obtenue par extraction organique des échantillons hydriques incriminés. La recherche de conditions d'essai plus représentatives de la réalité environnementale a conduit progressivement au développement de méthodes d'essai *in vivo* sur organismes supérieurs et organismes aquatiques en particulier, applicables sur échantillons bruts mais également *in situ*.

La synthèse bibliographique présentée ici est une revue des principaux essais de génotoxicité appliqués au contrôle des milieux environnementaux hydriques et à leurs sources de contamination : eaux continentales et marines, rejets hydriques d'origine domestique, industrielle ou agricole, sédiments de rivières et boues de station de traitement d'épuration. La préparation des échantillons à tester, l'intérêt et le champ d'application des différents essais *in vitro* ou *in vivo* mis en œuvre seront discutés.

Cette revue vise à aider au choix des méthodes d'essais, en fonction de l'objectif poursuivi, du type d'échantillon à examiner, et des ressources en temps et en matériel de l'expérimentateur.

2 - MÉTHODES DE CONCENTRATION DES ÉCHANTILLONS

Les niveaux de contamination chimique dans l'environnement aquatique sont le plus souvent inférieurs au $\mu\text{g/l}$; ceci implique, pour pouvoir détecter des effets après un temps d'expérimentation relativement court, de faire appel à des essais très sensibles et/ou à une étape de concentration des micropol-

luants. De ce fait, les essais ne sont pas réalisés directement sur l'échantillon brut prélevé dans l'environnement, mais sur une fraction concentrée des micropolluants de cet échantillon.

Deux techniques principales d'extraction sont utilisées :

- extraction liquide/liquide ou liquide/solide par solvants organiques (*tableau 1*) ;
- adsorption des micropolluants sur résine synthétique suivie d'une élution par des solvants organiques (*tableau 2*).

Ces extractions sont réalisées soit sur l'échantillon brut, soit après ajustement du pH à des valeurs neutres, acides ou basiques. Ces extractions sélectives, qui permettent la séparation des micropolluants selon leur polarité et leurs caractéristiques physico-chimiques, renseignent sur la contribution relative des différentes fractions à l'effet mutagène. La fraction neutre contient des composés organiques apolaires comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques, la fraction acide des micropolluants ionisables à caractère acide de type phénols et acides organiques, et la fraction alcaline des composés à caractère basique tels que les amines.

Les solvants employés par les auteurs sont pour la plupart apolaires, de sorte que les opérations d'extraction réalisées au pH généralement neutre des milieux hydriques privilégient l'extraction des micropolluants apolaires tandis que celle des micropolluants polaires (organiques ou minéraux) ne sera que partielle. L'acidification ou l'alcalinisation de l'échantillon, qui peut remédier à ce problème, présente aussi des inconvénients en induisant des modifications physico-chimiques de certains micropolluants, par exemple leur hydrolyse.

Une des limites de l'extraction par solvants est qu'elle ne permet pas toujours d'opérer avec des volumes importants d'échantillons. En revanche, c'est une méthode facilement applicable à l'étude des échantillons solides tels que les sédiments.

Lorsque le taux de contamination est très faible comme dans le cas des eaux de surface ou des eaux souterraines, l'utilisation d'une technique de concentration des micropolluants par adsorption sur résine est préférée, en raison de la facilité à traiter de grands volumes d'échantillon (plusieurs dizaines de litres). Toutefois, la filtration sur résine pour les eaux turbides expose au risque de colmatage et d'une perte possible des composés mutagènes liés aux particules.

Pour pallier les faibles quantités de micropolluants généralement présents dans les milieux analysés, les facteurs de concentration appliqués sont très élevés (*tableaux 1 et 2*). Cependant, les rendements d'extraction sont rarement précisés par les auteurs, bien que le résultat des essais et leur interprétation soient directement liés à ce paramètre : la préparation d'un échantillon par une méthode n'apportant qu'un faible rendement d'extraction des micropolluants pourrait conduire à un résultat faussement négatif.

Tableau 1 Techniques d'extraction par solvants utilisées pour la concentration des micropolluants organiques des milieux complexes liquides ou solides et facteurs de concentration correspondants (FC).

Table 1 Solvents used for extracting organic micropollutants from liquid or solid environmental samples and concentration factors (FC).

Echantillons	Solvants	FC	Auteurs
Eau du Rhin	Ether de Pétrôle pH initial	10 000	PREIN <i>et al.</i> (1978)
Eau de la Meuse	Dichlorométhane pH 7 (DCM)	5 000	VAN HOOF <i>et</i> VERHEYDEN
Effluents industriels	Fraction : pH7 : n-pentane puis DCM pH2, pH10 : DCM	1 000 1 000	(1981)
Eau de rivière	DCM pH2, pH7, pH12	10 000	GRABOW <i>et al.</i> (1981)
Effluents papeterie (stade de chloration)	Diethylether : Fraction acide neutre phénolique	325 125 170	RANNUG <i>et al.</i> (1981)
Effluents papeterie	Acétate d'éthyle 5 x 125 ml/1 effluent	/ ^a	HOLMBOM <i>et al.</i> (1984)
Eau de rivière Nishitakase (Japon)	Ethylether pH 1-7-11	/	MARUOKA <i>et al.</i> (1985)
Sédiments eaux intérieures. Ile Prince Edouard (Can.)	50 g + 50 ml DMSO à 10 % en milieu salin	1	XU <i>et al.</i> (1987)
Sédiments aquatiques, Grands Lacs (USA)	80 à 100 g + Benzène/Méthanol (60/40) 2 extr./DCM 2 extr. Fractionnement par filtration sur gel d'alumine et extraction sélective par Benzène ⇒ HAP (A1) Chloroforme + 0,75 % éthanol ⇒ N - CAP (A3)	/	FABACHER <i>et al.</i> (1988)
Sédiments aquatiques, Black River (USA)	Benzène/Méthanol (60/40), DCM Fractionnement après fixation sur gel d'alumine neutre (6 g d'extrait total). n-hexane ⇒ HC - al (A1) Benzène ⇒ HAP + S - CAP (A2) Chloroforme ⇒ N - CAP (A3) Méthanol ⇒ OH - HAP (A4)	/	WEST <i>et al.</i> (1988)
Sédiments aquatiques Puget Sound (USA)	Méthanol et DCM Extrait total	/	KOCAN <i>et</i> POWELL (1985)
Boues bassin de décantation, traitement du bois	Extrait total 25 g + DCM 150 ml Fractionnement DCM pH2, pH7, pH10	/	DONNELLY <i>et al.</i> (1987)
Boues station d'épuration urbaine (USA)	100 g de boue Acétone : 100 ml, 3 ext.	1 10 15	ENGL <i>et al.</i> (1988)

a : facteur de concentration non précisé.

Tableau 2 Systèmes résines adsorbantes/solvants d'élution, employés pour l'extraction et la concentration des micropolluants des milieux liquides complexes et facteurs de concentrations correspondants (FC).

Table 2 Solid phase extraction systems for concentrating micropollutants from complex liquid samples and concentration factors (FC).

Echantillons	Résine/solvants	FC	Auteurs
Eaux Lac Bloomington et Eaux d'alimentation	XAD ₂ /Acétone	3 000	HEARTLEIN <i>et al.</i> (1981)
Eaux Lac Bloomington et Eaux d'alimentation	XAD ₂ /Acétone	250	DE MARINI <i>et al.</i> (1982)
Eau d'alimentation (Athènes/Grèce)	XAD ₂ /Acétone – (n – hexane) 15 % (v/v)	10 000	ATHANASIOU et KYRTOPOULOS (1983)
Eaux de rivière	XAD ₂ /Ethyléther	/ ^a	MARUOKA <i>et al.</i> (1985)
Eau d'alimentation (Canada)	XAD ₂ /Hexane – Acétone (85 – 15)	/	DOUGLAS <i>et al.</i> (1986)
Effluents pâte à papier	XAD ₄ /Méthanol	/	HOLMBOM <i>et al.</i> (1984)
Effluents station de traitement industriel (Pétrochimie)	XAD ₄ à pH7 et pH2/Ethanol puis cyclohexane-éthanol	400	VAN DER GAAG <i>et al.</i> (1990)

a : facteur de concentration non précisé.

3 - MILIEUX ENVIRONNEMENTAUX HYDRIQUES ÉTUDIÉS

3.1 Eaux naturelles et eaux d'alimentation

Les lacs et les cours d'eaux sont généralement le réceptacle de rejets d'origine industrielle ou domestique ; mais ils peuvent être également l'objet de pollutions d'origine agricole, par lessivage des sols ou encore de pollutions d'origine atmosphérique. Ces rejets augmentent la charge en matières organiques des eaux superficielles. Dans le cas où ces eaux de surface sont utilisées pour préparer des eaux destinées à la consommation humaine, leur contamination peut se répercuter sur la qualité des eaux d'alimentation. Ainsi, dès 1974, BELLAR *et al.* et ROOK signalaient la formation de composés haloformes mutagènes par action du chlore sur la matière organique, lors de la potabilisation des eaux par chloration.

Dès lors, de nombreux travaux ont été effectués en vue d'étudier l'influence du traitement de potabilisation sur la génotoxicité des eaux d'alimentation. Il existe une abondante littérature et d'excellentes revues de synthèse sur cette question, que nous ne traiterons pas ici (FIESSINGER *et al.*, 1981; DE KRUIJF et

KOOL, 1985 ; COURTOIS *et al.*, 1986 ; RAM *et al.*, 1986 ; HORTH, 1990). Nous ne parlerons des travaux sur les eaux potables qu'au travers de leurs relations avec les eaux des milieux naturels dont elles sont issues. De nombreux auteurs ont étudié le potentiel génotoxique des eaux de surfaces et des eaux souterraines en rapport avec leur contamination initiale et ses conséquences possibles sur la qualité des eaux potables. Les essais *in vitro* et *in vivo* appliqués à ce type d'échantillons et les résultats obtenus par ces auteurs sont présentés dans les tableaux 3 et 4.

L'essai de génotoxicité le plus fréquemment utilisé est le test d'Ames réalisé à l'aide de mutants *his⁻* de *Salmonella typhimurium*, sur les fractions concentrées des micropolluants, plus rarement sur l'échantillon brut. Les souches TA 98 et TA 100, permettant de détecter des mutations, respectivement, par décalage du cadre de lecture du code génétique et par substitution de paires de bases, sont le plus souvent utilisées. Les résultats obtenus avec cet essai montrent que l'emploi du chlore dans les processus de potabilisation induit souvent la formation de composés mutagènes (DOUGLAS *et al.*, 1986 ; HEARTLEIN *et al.*, 1981) mais cet effet n'est pas systématique, et dépend de la présence de matières organiques et du type de filières de traitement. Les composés mutagènes formés par chloration sont des mutagènes directs, dont le caractère génotoxique ne requiert pas d'activation métabolique pour s'exprimer (NAZAR et RAPSON, 1980).

D'autres essais *in vitro* que le test d'Ames ont été employés pour ce type d'étude. Ils mettaient en œuvre des cultures de cellules de mammifères et faisaient appel à des critères de mesure de la génotoxicité tels que les échanges de chromatides sœurs (SCE), la formation d'aberrations chromosomiques (AC) ou celle de micronoyaux (MN). Ces essais se sont avérés de sensibilité équivalente sinon supérieure à celle des essais sur procaryotes.

Une étude tout à fait intéressante a été réalisée par GRUENER et LOCKWOOD (1979) sur une eau produite par recyclage d'eaux usées. Ces auteurs ont recherché des effets épigénétiques par un test de transformation cellulaire sur cellules embryonnaires d'origine humaine WI-38, afin de détecter les agents cancérogènes agissant par des mécanismes autres que ceux relevant d'une altération structurale de l'ADN. Leurs travaux ont révélé la présence de promoteurs de cancérisation dans l'eau potable étudiée.

Le souci de se rapprocher du contexte environnemental a conduit au développement d'essais *in vivo* sur organismes supérieurs aquatiques (mollusques, poissons, amphibiens), plus rarement sur végétaux (maïs, plantes herbacées) (tableau 4).

Ces essais ont été utilisés pour tester directement les eaux brutes, sans passer par une étape préalable de concentration des micropolluants ; ceci constitue un avantage certain au plan de la représentativité des résultats et de l'évaluation du risque au niveau environnemental. Ces essais utilisent les mêmes critères de mutations chromosomiques que les tests *in vitro* : échanges de chromatides sœurs, aberrations chromosomiques et micronoyaux. La durée d'exposition dans les études de PREIN *et al.* (1978), et de JAYLET *et al.* (1987) reste courte (3 à 12 jours) à l'échelle de la durée de vie de ces organismes aquatiques.

Tableau 3 Résultats des essais de génotoxicité *in vitro* réalisés sur eaux de surface, eaux souterraines et eaux d'alimentation testées brutes ou après concentration des micropolluants.

Table 3 *In vitro genotoxicity tests carried out with raw or extracted samples of surface and drinking waters.*

Echantillons	Fractions testées	Ames		SCE ^a	MN ^a		Autres tests	Auteurs
		- S9	+ S9		- S9	+ S9		
Eaux potables issues d'eaux usées recyclées	Extrait 0,1 - 0,3 ml 0,2 - 0,3 ml	-	-				RO ^b (- S9)(+ S9) - + TC ^c + +	GRUENER et LOCKWOOD (1979)
TA98								
Eaux de surface	Extraits :							
- Eaux du Rhin	Avril	+	++					SLOOF et VAN KREIJL (1982)
	Juin	++	++					
	Octobre	+++	+++					
	Février	+	+					
- Eaux de la Meuse	Avril	-	-					
	Juin	-	-					
	Octobre	+	+					
	Février	-	-					
- Eaux lacustres témoin	mêmes mois	-	-					
TA98								
Eaux potables :	Extraits	TA100					AC ^a	ATHANASIOU et KYRTOPOULOS (1983)
- origine lacustre ^d (Athènes, Grèce)	2 mg/ml	+++	++	+			+	
- origine souterraine (Patras, Grèce)	20 mg/ml							
	1 mg/ml	-	-					
	10 mg/ml			-			-	
TA98								
Eaux de surface et souterraines	Extraits :	TA100						DOUGLAS <i>et al.</i> (1986)
- avant potabilisation	surface	-	-	+	±			
	souter.	-	-	+		+		
- après potabilisation	surface	+	-	+	±			
	souter.	+	-	+		-		
TA 1538								
Eau rivière Nishitakase, Japon	Extrait total 100 µg	++	+++					MARUOKA <i>et al.</i> (1985)
	Fractions :							
	neutre 45 µg	++	+++					
	basique 5,7 µg	++	+++					
	acide 23 µg	-	±					

a : Essai réalisé sur cellules CHO ; b : essai de résistance à l'ouabaine réalisé sur cellules de poumons de hamster chinois mâle (V79) ; c : essai de transformation cellulaire réalisé sur cellules d'embryons humains (WI - 38) ; d : contamination par des pesticides.

Résultat négatif (-), à la limite de la significativité (±), positif (+), très positif (+++).

Tableau 4 (p. 294-296)

Résultats des essais de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* effectués sur eaux douces, eaux marines et eaux d'alimentation et sur fractions concentrées des micropolluants identifiés ou non.

Table 4 (p. 294-296)

In vitro and in vivo genotoxicity test carried out on raw or concentrated samples of fresh and drinking waters, and marine waters.

Echantillons	Type de polluants	Fractions testées	ESSAIS <i>IN VITRO</i>		Aberrations chromosomiques métaph. ab %	ESSAIS <i>IN VIVO</i>	Autres tests	Auteurs	
			Ames - S9	+ S9		Micronoyau cell. à MN ‰			
Eaux du Rhin (Belgique)	Organiques	Eaux brutes	TA 100		<i>U. pygmaea</i>		•	PREIN <i>et al.</i> (1978)	
		Extraits :			(B) 15 ± 3 ^a		•		
		- Bases Ar.	-	-					
		- HC al.	-	-					
		- HAP	+	+					
	- Ox	-	-						
Eaux souterraines témoins		Eau brute			(B) 8 ± 4				
		Extraits	-	-					
Eaux du Rhin (Hollande)	Organiques :	Eau brute					SCE	ALINK <i>et al.</i> (1980)	
	- Bases Ar.						SCE/chromosome		
	- HAP						<i>U. pygmaea</i> ^a		
	- Ox					(B) 0,13 ± 0,02			
Eaux souterraines témoin						(G) 0,15 ± 0,02			
						(B) 0,06 ± 0,01			
						(G) 0,06 ± 0,01			
Eaux du Rhin (Hollande)		Eau brute			<i>U. pygmaea</i> ^b		<i>U. pygmaea</i> ^b	HOOFTMAN <i>et VINK</i> (1981)	
						(B) 4,3 ± 3,9			(B) 0,23 ± 0,08
						(N) 4,0 ± 3,6			(N) 0,38 ± 0,18
Eaux témoins					(B) 0,0		(B) 0,12 ± 0,07		
					(N) 0,0		(N) 0,12 ± 0,05		

Echantillons	Type de polluants	Fractions testées	ESSAIS IN VITRO		Aberrations chromosomiques métaph. ab %	ESSAIS IN VIVO		Autres tests	Auteurs
			- S9	+ S9		Micronoyau	cell. à MN %		
Port de Rovjin Yougoslavie Site contaminé Site témoin		Eau brute			<i>M. galloprovincialis</i> (B) 10,1 ± 6,2 3,9 ± 1,9				AL SABTI et KURELEC (1985)
Baie Los Angeles (Californie) Site contaminé Site témoin Site contaminé Site témoin	HAP DDT, PCB	Eau brute				<i>G. lineatus</i> PS (E) 3,4 ± 2,7 0,8 ± 1,1 <i>P. clathratus</i> PS (E) 6,8 ± 5,1 0,6 ± 0,6			HOSE <i>et al.</i> (1987)
Eaux du robinet	Produits de chloration Cl ⁻ libre ≤ à 2 mg/l	Eau brute Eau témoin déchlorée				<i>P. waltl</i> (E) 31 ± 2,9 9 ± 3,5			JAYLET <i>et al.</i> (1987)
Lagon vénitien Sites pollués 1 2 3 Sites témoins 4 5		Eau brute Eau brute				<i>M. galloprovincialis</i> (B) 4,2 ± 0,3 2,2 ± 0,2 4,7 ± 0,2 (B) 3,2 ± 0,3 3,6 ± 0,2			BRUNETTI <i>et al.</i> (1988)
Sites pollués 1 2 Site témoin	Rejets industriels divers	Eau brute Eau brute				<i>M. edulis</i> PS (B) 2,9 2,3 0,9			WRISBERG <i>et al.</i> (1992)

Echantillons	Type de polluants	Fractions testées	ESSAIS <i>IN VITRO</i>		Aberrations chromosomiques métaph. ab %	ESSAIS <i>IN VIVO</i>	Autres tests	Auteurs
			- S9	+ S9		Micronoyau cell. à MN %		
Sites pollués Estuaire Port Témoin	Origines diverses	Eau brute				<i>M. galloprovincialis</i> ^b TR (B) 6,2 ± 1,6 7,2 ± 3,9 2,2 ± 0,9		SCARPATO <i>et al.</i> (1990)
Eaux lacutres Bloomington, USA - avant potabilisation - après potabilisation Témoin	Pesticides	Eau brute Ext. 100 µl	-	-	TA 100		Mutation génique sur Mais 1,3 ^c	HEARTLEIN <i>et al.</i> (1981)
		Eau brute Ext. 100 µl	-	++			1,1	
							1,7	
Eaux lacutres Bloomington, USA - avant potabilisation - après potabilisation Témoin	Pesticides	Eau brute Ext. 100 µl	-	++	TA 1536		7,7 ± 1,9	DE MARINI <i>et al.</i> (1982)
		Eau brute Ext. 100 µl	-	++			1,5 ± 0,3	
							2,3 ± 0,7	

(B) : cellules de branchie ; (N) : cellules de nageoire ; (G) : cellules de gonade mâle ; (E), érythrocytes ; PS : organismes prélevés sur le site d'étude ; TR, organismes transférés du site témoin sur le site témoin sur le site pollué ; a : Durée du test, 3 jours ; b : Durée du test, 14 jours ; c : grains de pollen révertants/10⁵ grains de pollen.

Résultat négatif (-), positif (+ ou ++).

Les études conduites par PREIN *et al.* (1978), HEARTLEIN *et al.* (1981) et DE MARINI *et al.* (1982) sur poissons ou maïs témoignent d'une meilleure sensibilité des essais *in vivo* par rapport au test d'Ames. L'originalité de l'essai de mutation reverse sur maïs réalisé par HEARTLEIN *et al.* (1981) et DE MARINI *et al.* (1982) mérite d'être soulignée, dans la mesure où l'utilisation de plantes supérieures en mutagénèse est rare par rapport aux essais sur cellules ou organismes animaux.

La recherche d'adduits à l'ADN, reconnus comme indicateurs précoces d'un effet initiateur, est une méthode en plein développement et applicable aux organismes exposés en laboratoire (SHUGART *et al.*, 1987 ; KURELEC *et al.*, 1988 ; Mc CARTHY *et al.*, 1989) ou prélevés sur des sites contaminés (KURELEC *et al.*, 1990). La méthode du postmarquage au ^{32}P (RANDERATH *et al.*, 1981), non spécifique, peut être mise en œuvre sans une connaissance préalable des adduits formés et être appliquée dans le cas d'exposition à des mélanges complexes. Cette technique est sensible et permet de détecter la présence d'adduits à l'ADN avec une fréquence de $1/10^{10}$ nucléotides (KURELEC *et al.*, 1990). La détection des adduits par utilisation des techniques de fluorescence comme cela a été réalisé par Mc CARTHY *et al.* (1989) pour la recherche des adduits du B(a)P, ou par utilisation d'anticorps spécifiques anti-adduits, est une méthode réservée, au contraire, à la détection d'adduits identifiés ; elle est utile pour étudier les niveaux d'exposition des populations à des dérivés génotoxiques donnés.

3.2 Les rejets industriels

L'activité industrielle est souvent à l'origine de la pollution des cours d'eau. Dès lors, l'évaluation de la toxicité, et plus récemment, de la génotoxicité des rejets industriels s'est imposée.

Parmi les tests *in vitro* appliqués à l'étude des rejets, le test d'Ames est encore l'essai le plus utilisé pour tester les fractions concentrées de ces échantillons ; il est plus rarement appliqué directement aux effluents bruts (tableau 5).

Au cours de ces dix dernières années, l'utilisation d'essais *in vivo* s'est multipliée. Les travaux de DAS et NANDA (1986), VAN DER GAAG *et al.* (1990) et de WRISBERG et VAN DER GAAG (1992), mettent en évidence leur sensibilité et leur capacité supérieure à celle des tests *in vitro* à détecter la mutagénicité d'échantillons non concentrés.

Les résultats des essais, *in vitro* ou *in vivo*, sont néanmoins variables en fonction du type d'industrie et de la nature des effluents. Le blanchiment de la pâte à papier par le chlore est souvent générateur de composés mutagènes, vis-à-vis desquels les souches de *Salmonella typhimurium* *his*⁻ présentent une sensibilité élevée leur permettant de détecter la mutagénicité de ces micropolluants même sur effluents bruts (NAZAR et RAPSON, 1980 ; HOLMBOM *et al.*, 1984 ; DAS et NANDA, 1986 ; WRISBERG et VAN DER GAAG, 1992).

Echantillons	Type de polluants	Fractions testées	ESSAIS <i>IN VITRO</i>		Autres tests	ESSAIS <i>IN VIVO</i>		Auteurs
			Ames - S9	+ S9		SCE SCE/chromosome	Micronoyau cell. à MN %	
Effluents de papeterie (stade de blanchiment, Cl ₂ et/ou ClO ₂)	Dérivés de chloration	0,4 ml/boîte effluent brut : Cl ₂ ClO ₂ /Cl ₂ 70/30 ClO ₂		TA98 TA100 ++++ + -				NAZAR et RAPSON (1980)
Effluents de papeterie (stade de chloration)	Dérivés de chloration	effluent brut 0,1 ml Lyoph 0,1 ml Fractions : Acide 25 µl Neutre 25 µl Phénol. 25 µl		TA100 TA1535 + ++ - - +++ + +++ + - -	HGPRT +			RANNUG <i>et al.</i> (1981)
Eaux de la Meuse et rejets industriels afférents	Eau Meuse Papeterie Sucrierie Engrais Trait. surface	Ext. total " " " "		TA98 TA1535 + + - - - - - - - -				VAN HOOF et VERHEYDEN (1981)
	Cokerie	Ext. total Ext pH 2 pH 7 pH 10		TA98 TA100 + + + + - - + +				

Echantillons	Type de polluants	Fractions testées	ESSAIS <i>IN VITRO</i>		Autres tests	ESSAIS <i>IN VIVO</i>		Auteurs
			Ames - S9	+ S9		SCE SCE/chromosome	Micronoyau cell. à MN %	
Effluents de papeterie (stade de chloration)	Dérivés de chloration dont TCHF	Extrait :	TA100					HOLMBOM <i>et al.</i> (1984)
		0,5 ml éq. eff.	++					
		1,0 ml éq. eff.	+++					
		TCHF :						
		20 ng/bte	++	-				
Effluents totaux de papeterie (rejets de tous les stades de blanchiment de la pâte à papier)		Effluent brut					<i>H. fossilis</i> 30 j	DAS et NANDA (1986)
		200 ml/l					(E) 1,25 ± 0,1	
		400 ml/l					0,5 ± 0,4	
		Témoin					0,5 ± 0,2	
Effluents d'industrie chimique			TA100			<i>N. rachowi</i> (B)		VAN DER GAAG (1988)
		Effluent brut	±	±		48 h	96 h	
		50 ml/l					0,15	
		200 ml/l				0,25		
		Témoin				0,05	0,05	
		Extrait :						
		4 ml éq/bte	-	+				

a. numéro de l'effluent où les dérivés ont été retrouvés.

Lors de l'étude d'un effluent épuré provenant d'une usine pétrochimique, VAN DER GAAG *et al.* (1990) ont comparé les réponses de deux essais *in vitro*, Ames et SOS chromotest, et de trois essais *in vivo*, échanges de chromatides sœurs sur poissons et essais micronoyaux sur moules et amphibiens. Les tests *in vitro* n'ont donné de résultats positifs qu'avec les fractions concentrées ; en revanche, les essais *in vivo* ont révélé la génotoxicité de l'effluent brut (tableau 5). Dans le cadre de cette étude, le test SCE sur *Nothobranchius rachowi*, qui donne une réponse positive après 96 heures d'exposition, est apparu particulièrement sensible. Des études comparatives de cet ordre sont très intéressantes pour évaluer les performances des différents modèles et devraient être plus fréquentes.

3.3 Sédiments et boues de station d'épuration

Le compartiment sédimentaire est souvent négligé lors des études environnementales bien qu'il joue un rôle important dans l'accumulation des micropolluants et leur relargage éventuel dans la colonne d'eau.

L'étude de la génotoxicité des sédiments passe généralement par une étape préalable d'extraction des micropolluants adsorbés sur les particules de sédiment, et fait appel à des essais *in vitro*. L'extraction est réalisée par des solvants organiques avec ou sans modification de pH (tableau 1) ; ce protocole est intéressant à des fins analytiques, si l'on souhaite réaliser une extraction totale des micropolluants. Il pose par contre des problèmes de représentativité sur un plan environnemental ; une lixiviation en milieu aqueux (ou élutriation) paraît plus représentative des phénomènes de relargage qui peuvent avoir lieu lors d'épisodes de crue ou à l'occasion de dragages.

En raison des facteurs de concentration élevés appliqués lors de la préparation des échantillons, les volumes d'extraits disponibles sont faibles rendant implicite le recours aux essais *in vitro* (tableau 6). WEST *et al.* (1988) et FABACHER *et al.* (1988) ont trouvé une meilleure sensibilité du test de synthèse non programmée de l'ADN (test UDS, qui mesure l'induction des systèmes de réparation de l'ADN), comparé au test de mutation génique HGPRT⁻ aux loci de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase induisant une résistance à la 6-thioguanine.

A notre connaissance, aucun essai *in vivo* sur vertébrés ou invertébrés aquatiques, benthiques ou épibenthiques n'a été encore développé et validé pour l'étude directe de la génotoxicité des sédiments. Des essais de mutagenèse sur plantes supérieures ont cependant été appliqués par PLEWA (1984) pour évaluer la génotoxicité des boues d'une station d'épuration de Chicago aux USA (tableau 6). Ils consistent en un essai de mutation génique sur maïs et un test micronoyau sur une plante herbacée, *Tradescantia paludosa*, où les plantes sont cultivées dans un sol mélangé au sédiment à tester en proportions déterminées. Les résultats positifs obtenus par cet auteur montrent qu'un transfert de micropolluants génotoxiques peut avoir lieu de la boue vers la plante.

Tableau 6 Résultats des essais de génotoxicité *in vitro* effectués sur sédiments hydriques et boues de station de traitement d'épuration.
Table 6 *In vitro genotoxicity test carried out on aquatic sediments and treatment plant sludges.*

Echantillons	Type de contaminants	Fractions testées	Ames		UDS ^a	Autres tests	Auteurs
			- S9	+ S9			
Sédiments Puget Sound (USA) 6 sites	HAP PCB HC chlorés, métaux	Ext. total (n = 6) 5 sites contaminés site peu contaminé Ext. total				Ab Chr ^b ++ + -	KOCAN et POWELL (1985)
Témoin							
Sédiments eaux intérieures. Ile du Prince Edouard (Can) n = 6 échantillons		Ext. total 1/6 1/6 4/6				SOS - S9 + S9 + - - + - -	XU <i>et al.</i> (1987)
Sédiments Black River (USA)	rejets cokeries aciéries	Ext. total Fractions : A1 : HC-al A2 : HAP, S-HAP A3 : N-CAP A4 : OH-HAP		TA98 - - + + -	++ - ++ ++ +		WEST <i>et al.</i> (1988)
Sédiments Black River (USA)	Aromatiques	Ext. total Fractions ^d : A2 A3	- - -	TA98 - -	++ +++ ++	HGPRT ^c + +	
Cuyahoga River	Aromatiques PCB, métaux	Ext. total Fractions : A2 A3	- - -	- - -	++++ ++++ ++++	++ +++ ++	FABACHER <i>et al.</i> (1988)
Menomines River	Arsenic HAP	Ext. total Fractions : A2 A3	- - -	- + -	+ ++ ++	+ ++ +++	
Fox River	Phénols PCB, dioxines	Ext. total Fractions : A2 A3	- - -	- - -	++++ ++ +	+ + +	
Munuscong	témoin peu contaminé	Ext. total Fractions : A2 A3	- - -	- + -	+ ++ +	- - -	FABACHER <i>et al.</i> (1988)

Echantillons	Type de contaminants	Fractions testées	Ames		UDS ^a	Autres tests	Auteurs
			- S9	+ S9			
Boues de station d'épuration	Rejets industriels (< 60 %) et domestiques (n = 34)	Ext. total	-	+			BABISH <i>et al.</i> (1983)
		25/34	+	-			
		2/34	+	+			
		6/34	-	-			
		1/34					
Boue de station d'épuration Chicago		Facteur de concentration : 1/2				MN trad. ^e +	PLEWA (1984)
Champaign		1/12 (lyoph.) 4				-	
Boues/bassin décantation traitement du bois	créosote, PCP, crésols, phénols, HAP, HC chlorés	Ext. total	-	+	TA98.TA100		DONNELLY <i>et al.</i> (1987)
		Fractions :	TA98,TA100, TA1538				
		acide	-	+			
		basique	-	+			
		neutre	-	+			
Boues station d'épuration urbaine (Chicago-USA)	organiques et minéraux	Extraits (μl)				SCE ^g	ENGL <i>et al.</i> (1988)
		1 ^{re} : 100	-	-	- S9	+ S9	
		1 500	-	-			
		2 ^e : 100	-	-			
		1 000	+	+			
		3 ^e : 10	+	-			

a : essais sur hépatocytes primaires de rat ; b : essais sur cellules de gonade de truite arc-en-ciel (RTG-2). c : essais sur cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) ; d : Fractions A2 et A3 définies par West *et al.* (1988). e : Test micronoyau sur *Tradescantia paludosa* ; f : Test de mutation directe (synthèse de l'amidon dans les grains de pollen) ; g : essais sur lymphocytes humains (résultats obtenus après 2 heures d'exposition et 76 heures de culture). Résultat négatif (-), positif (+), très positif (+++).

Actuellement, une politique de valorisation agricole des boues de station d'épuration tend à se développer. Du point de vue réglementaire, la décision d'épandage de ces boues est basée sur leur teneur en métaux lourds. Ces tests sur *T. paludosa* et sur maïs seraient donc d'un intérêt certain pour définir la qualité « écotoxicologique » des boues de station d'épuration.

4 - COMPARAISON DES PERFORMANCES DES ESSAIS IN VITRO ET IN VIVO VIS-A-VIS DE MUTAGÈNES CONNUS

L'évaluation de la sensibilité des différents tests *in vitro* et *in vivo* employés peut être réalisée en comparant leur réponse à des mutagènes connus, en tenant compte des niveaux de concentrations testées et de la durée d'exposition. Les tableaux 7 et 8 font la synthèse des réponses des précédents essais aux substances génotoxiques utilisées comme contrôles positifs.

Les essais réalisés sur bactéries (tableau 7), Ames et SOS-chromotest, rapides (48 h et 2 h d'exposition respectivement) et faciles à mettre en œuvre, apparaissent sensibles à une large gamme de mutagènes. Le SOS-chromotest est utilisé pour les échantillons environnementaux, mais moins systématiquement que le test d'Ames (XU *et al.*, 1987 ; HARWOOD *et al.*, 1989 ; VAN DER GAAG *et al.*, 1990). Les études comparatives sur ces échantillons manquent pour juger de la sensibilité relative de ces deux tests ; les éléments de comparaison proviennent essentiellement d'études sur produits purs (QUILLARDET *et al.*, 1982 ; VON DER HUDE *et al.*, 1988) qui font apparaître une sensibilité spécifique de l'un ou l'autre réactif bactérien en fonction de la structure chimique des composés étudiés. Ainsi, les acridines et les amines aromatiques positives avec le test d'Ames, n'induisent généralement pas de réponse SOS ; inversement, des furocoumarines positives avec le SOS chromotest, peuvent donner des réponses négatives sur *Salmonella typhimurium* his⁻ (LECOINTE, 1984).

Le test d'aberrations chromosomiques sur cellules de poisson semble être plus sensible que les essais sur cellules de mammifères compte tenu des concentrations d'exposition à des contrôles positifs comme le B(a)P ou le MNNG et de la durée de l'essai. Les essais de résistance à l'ouabaïne et de mutagenicité au locus HGPRT⁻ apparaissent de sensibilité équivalente (tableau 7).

La sensibilité des tests *in vivo* est en partie liée au choix de l'organisme ; ainsi les larves de l'annélide *Neanthes arenaceodentata* sont peu sensibles au B(a)P et au MNNG comparés aux mollusques, poissons et amphibiens (tableau 8). Les deux espèces de poissons, *Umbra pygmaea* et *Nothobranchius rachowi* apparaissent de sensibilité équivalente vis-à-vis de l'EMS ; pour ce qui concerne les bivalves marins, *Mytilus galloprovincialis* semble plus sensible que *Mytilus edulis*.

La sensibilité des tests *in vivo* dépend aussi du critère utilisé pour mesurer l'effet génotoxique. Les critères SCE et AC donnent des résultats du même ordre de grandeur chez *U. pygmaea* et *N. rachowi* (VAN DER HOEVEN

et al., 1982 ; HOOFTMAN, 1981 ; HOOFTMAN et VINK, 1981). Quant au critère micronoyau, il semble moins sensible que les précédents si l'on se base sur les niveaux de concentrations clastogènes plus élevées que celles induisant les échanges de chromatides sœurs ou les aberrations chromosomiques.

5 - DISCUSSION

L'ensemble de ces résultats montre d'une manière générale que les essais *in vivo*, qui permettent de détecter la présence de micropolluants génotoxiques dans les milieux naturels sans passer par une étape de concentration, sont plus sensibles que les essais *in vitro*. Leur sensibilité dépend toutefois du taux de croissance de l'organisme utilisé ou du taux de division du tissu choisi pour l'étude des critères de génotoxicité. La probabilité de mettre en évidence des aberrations chromosomiques, des échanges entre chromatides sœurs ou des micronoyaux est directement liée à l'index mitotique du tissu cellulaire considéré ; ceci explique le choix privilégié d'individus au stade larvaire, ou l'examen des cellules sanguines ou lymphocytaires pour les études de génotoxicité *in vivo*. Cet élément peut expliquer la sensibilité plus faible d'essais qui seraient réalisés sur des organismes adultes ; ce facteur « développement » mérite donc d'être examiné avant de déclarer telle espèce peu sensible en tant que modèle de génotoxicité *in vivo*. Par le même mécanisme, des micropolluants inhibiteurs de croissance peuvent empêcher l'expression de la génotoxicité d'autres substances présentes conjointement dans des milieux complexes, d'où l'attention particulière qui doit être portée à la toxicité de l'échantillon aux différentes dilutions testées. Ce problème justifie la démarche de certains auteurs de séparer et tester les différentes fractions des micropolluants.

Si le plus souvent, les essais *in vitro* répondent positivement après une étape de concentration des micropolluants, il est des cas où des réponses positives peuvent être obtenues sur échantillons bruts ; ce qui peut témoigner d'un taux de pollution élevé de l'échantillon, mais aussi d'une sensibilité spécifique du système cellulaire utilisé à certaines catégories de micropolluants. C'est le cas de la sensibilité particulière de *Salmonella typhimurium* *his*⁻ aux produits de chloration des eaux et aux micropolluants présents dans les rejets de la métallurgie ou de la pétrochimie (NAZAR et RAPSON, 1980 ; RANNUG et al., 1981 ; VAN DER GAAG, 1988).

Cette sensibilité plus faible des essais sur cellules *in vitro* pourrait être liée en partie à la filtration stérilisante sur membrane, utilisée très souvent comme procédé de décontamination bactérienne des milieux hydriques avant leur ajout dans le milieu de culture cellulaire. La filtration élimine la fraction particulière de taille égale ou supérieure à 0,22 μm , sur laquelle peuvent être adsorbés nombre de micropolluants organiques et minéraux. Parmi les autres procédés de stérilisation possible, la stérilisation gamma a été envisagée par VAN DER GAAG et al. (1990), mais ce procédé n'est pas à la portée de tout laboratoire et une influence du rayonnement sur la structure des micropolluants ne doit pas être exclue.

Tableau 7 Sensibilité des essais *in vitro* à différents mutagènes utilisés comme contrôles positifs.

Table 7 Sensitivity of *in vitro* genotoxicity tests to various positive controls

Molécules Essais	Types cellulaires	Concentrations massiques / molaires	Durée Exposition / Essai	Résultats	Auteurs
Benzo(a)pyrène (B(a)P)				rés/10 ⁶ cell	
RO	V79	1 µg/ml / 4 µM	4 h / 14 j	120	GRUENER et LOCKWOOD 1979
		Témoin		0	
TC	W138	1 µg/ml / 4 µM	2 h / 5 sem.	0	
		Témoin		0	
				anaph. ab. %	
AC	RTG2	0,05 µg/ml / 0,2 µM	48 h / 76 h	20	KOCAN et POWELL 1985
		Témoin		10	
Ames	<i>S. typhimurium</i>			FI	
	TA 100	1 µg/bte / 4 nmol/bte	48 h	4,7	MARON et AMES 1983
		1µg/bte / 4 nmol/bte	48 h	2,0	QUILLARDET
SOS	<i>E. Coli</i>	176 ng/essai / 0,7 nmol/essai	2 h	2,0	et al. 1982
		76 ng/essai / 0,1 nmol/essai	2 h	2,7	VON DERHUDE et al. 1988
N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)				rés/10 ⁶ cell	
RO	V79	1 µg/ml / 6,8 µM	4 h / 14 j	162	GRUENER et LOCKWOOD 1979
		Témoin		0,6	
TC	W138	1µg/ml / 6,8 µM	2 h / 5 sem.	0	
		Témoin		0	
				SCE/métaph.	ATHANASIOU
SCE	CHO	1,8 µg/ml / 12,2 µM	2 h / 26 h	43,6 ± 2,7	et KYRTOPOULOS
		Témoin		7,7 ± 0,5	1983
				anaph. ab. %	
AC	RTG2	0,5 µg/ml / 3,4 µM	48 h / 76 h	30	KOCAN et POWELL 1985
		Témoin		10	
Ames	<i>S. typhimurium</i>			FI	
	TA 100	103 ng/bte / 0,7 nmol/bte	48 h	2,0	QUILLARDET
SOS	<i>E. Coli</i>	22,1 ng/essai / 0,15 nmol/essai	2 h	2,0	et al. 1982
		14,7 ng/essai / 0,1 nmol/essai	2 h	2,7	VON DER HUDE et al. 1988
DiméthylNitrosamine (DMN)				cell en rép. %	
UDS	Hpr	740 mg/ml / 10 mM	18 h / 9 j	96	WEST et al. 1988
		Témoin		2	
		74 µg/ml / 1 mM	18 h / 9 j	88	FABACHER et al. 1988
		Témoin		1	

Molécules Essais	Types cellulaires	Concentrations massiques / molaires	Durée Exposition / Essai	Résultats	Auteurs
Méthylméthanesulfonate (MMS)				FI	MARON et AMES
Ames	TA 100	1,1 µg/bte / 10 nmol/bte	48 h	13,6	1983
	TA 100	70,5 µg/bte / 640 nmol/bte	48 h	2,0	QUILLARDET
SOS	<i>E. coli</i>	2,1 µg/essai / 19 nmol/essai	2 h	2,0	<i>et al.</i> 1982
		- -		rés/10 ⁶ cell	
HGPRT	CHO	5,5 µg/ml / 50 µM	4 h / 8 j	143	FABACHER
		Témoin		3	<i>et al.</i> 1988
Éthylméthanesulfonate (EMS)				rés/10 ⁵ cell	
HGPRT	CHO	620 µg/ml / 5 mM	4 h / 8 j	23,7	RANNUG
		Témoin		0,2	<i>et al.</i> 1981
				SCE/Chrom	
SCE	Lh	620 µg/ml / 5 mM	1 h / 73 h	0,33 ± 0,03	ENGL <i>et al.</i>
		Témoin		0,18 ± 0,04	1988
				FI	
AMES	TA 100	3 mg/bte / 24 µmol/bte	48 h	2,0	QUILLARDET
SOS	<i>E. coli</i>	61 µg/essai / 0,5 µmol/essai	2 h	2,0	<i>et al.</i> 1982
	<i>E. coli</i>	12,4 µg/essai / 0,1 µmol/essai	2 h	1,8	VON DER HUDE
					<i>et al.</i> 1988

TA 100 : souche de *S. typhimurium his⁻*. FI : facteur d'induction calculé par rapport au témoin : Ames positif pour FI = 2, SOS positif pour FI = 1,5.

La sensibilité de certains essais *in vitro* pourrait être optimisée en jouant sur le protocole expérimental : ainsi une préincubation de l'échantillon et de la souche bactérienne avant incorporation au milieu gélosé améliore la sensibilité du test d'Ames, mais au prix d'un alourdissement non négligeable de la procédure expérimentale.

Au plan de la facilité de mise en œuvre, il est clair que les essais *in vitro* présentent des avantages indéniables en tant que systèmes miniaturisés, se prêtant parfaitement au dépistage à grande échelle de la génotoxicité. Ils requièrent de faibles volumes d'échantillons et sont bien adaptés à l'étude des fractions concentrées des micropolluants extraits de milieux contaminés.

Les modèles eucaryotes sont cependant d'une utilisation plus délicate que les modèles procaryotes et demandent une bonne maîtrise des techniques de cultures cellulaires.

Le coût des essais *in vitro* est modéré dans la mesure où leur lecture est aisée et rapide, comme dans le cas des essais basés sur l'examen des mutations reverses ou directes (relatives au locus de l'histidine et de l'HGPRT) ou sur l'induction des systèmes de réparation SOS de l'ADN visualisée colorimétriquement. Par contre, ce coût s'accroît s'il s'agit d'essais cytogénétiques sur cellules eucaryotes, dont les lectures microscopiques sont longues et requièrent un personnel expérimenté.

Tableau 8 Sensibilité des essais *in vivo* à différents mutagènes utilisés comme contrôles positifs.

Table 8 Sensitivity of *in vivo* genotoxicity tests to various positive controls

Molécules Essais	Organismes	Concentrations massiques / molaires	Durée Exposition / Essai	Résultats	Auteurs
Benzo(a)pyrène (B(a)P)					
SCE	<i>N. arenaceodentata</i> (larves)	2,5 mg/l / 10 µM	48 h	SCE/chrom 0,42	PESH <i>et al.</i> 1981
		Témoin		0,22 ± 0,04	
				Métaph. ab. %	
AC		250 mg/l / 1 mM	48 h	0	
		Témoin		0	
AC	<i>N. rachowi</i>	10 µg/l / 40 nM	96 h	(B) 2,0 ± 1,6	HOOFTMAN 1981
		Témoin	48 h	0,5 ± 0,1	
				0,5 ± 0,1	
	<i>M. galloprovincialis</i>	1 µg/l / 4 nM	48 h	(B) 8,8 ± 6,8	AL SABTI et KURELEC 1985
		5 µg/l / 20 nM		20,6 ± 15,4	
		Témoin		3,0 ± 2,5	
MN	<i>M. galloprovincialis</i>	25 µg/l / 0,1 µM	48 h	cell à MN % (B) 24,0 ± 9,0	SCARPATO <i>et al.</i> 1990
		Témoin		2,9 ± 1,2	
	<i>P. waltl</i> (larves)	25 µg/l / 0,1 µM	12 j	(E) 27,0 ± 5,0	JAYLET <i>et al.</i> 1986
		Témoin		4,0 ± 1,6	
Ethylméthanesulfonate (EMS)					
SCE	<i>N. rachowi</i>	50 mg/l / 0,4 mM	48 h	SCE/chrom (B) 0,55	VAN DER GAAG 1988
		Témoin		0,08	
SCE	<i>N. rachowi</i>	120 mg/l / 1 mM	3 j	(B) 0,64 ± 0,03	VAN DER HOEVEN <i>et al.</i> 1982
		Témoin		0,1	
	<i>U. pygmaea</i>	120 mg/l / 1 mM	5 j	(B) 0,63 ± 0,05	
		Témoin		0,05	
AC	<i>N. rachowi</i>	40 mg/l / 0,3 mM	48 h	métaph. ab. % (B) 9,2 ± 2,8	HOOFTMAN 1981
		Témoin		0,0	
	<i>U. pygmaea</i>	40 mg/l / 0,3 mM	48 h	(B) 7,5 ± 1,0	HOOFTMAN et VINK 1981
		Témoin		(N) 6,0 ± 2,8	
				(B) 0,0	
				(N) 0,5 ± 1,0	
MN	<i>M. edulis</i>	100 mg/l / 0,8 mM	10 j	cell à MN % (B) 2,4	VAN DER GAAG <i>et al.</i> 1990
		Témoin		0,4	
		100 mg/l / 0,8 mM	14 j	(H) 4,1 ± 1,4	WRISBERG <i>et al.</i> 1992
		Témoin		1,3 ± 0,8	
	<i>P. waltl</i> (larves)	100 mg/l / 0,8 mM	4 j	(E) 70 ± 13	JAYLET <i>et al.</i> 1986
		Témoin	10 j	190 ± 12	
				5,0 ± 2,7	

Molécules Essais	Organismes	Concentrations massiques / molaires	Durée Exposition / Essai	Résultats	Auteurs
Cyclophosphamide (CP)					
SCE	<i>N. arenaceodentata</i> (larves)	26 µl / 0,1 µM	48 h	SCE/chrom 0,42	PESH <i>et al.</i> 1981
	Témoin			0,22 ± 0,04	
	<i>N. rachowi</i>	25 mg/l / 90 µM	96 h	(B) 0,20	VAN DER GAAG 1988
	Témoin		48 h	0,35 0,08	
		25 mg/l / 90 µM	96 h	(B) 0,30	VAN DER GAAG <i>et al.</i> 1990
	Témoin			0,08	
Mitomycine (MMC)					
SCE	<i>N. arenaceodentata</i> (larves)	1,6 mg/l / 5 µM	48 h	SCE/chrom 1,3	PESH <i>et al.</i> 1981
	Témoin			0,4	
	<i>M. edulis</i>	2 µg/l / 6 nM	24 h/96 h	(B) 0,42 ± 0,12	DIXON et CLARKE 1982
	Témoin			0,15 ± 0,07	
MN	<i>M. galloprovincialis</i> <i>s</i>	30 µg/l / 0,1 µM	48 h	cell à MN % (B) 10	MAJONE <i>et al.</i> 1987
	Témoin			2,2	
	<i>H. fossilis</i>	0,5 mg/kg / 1,5 µmol/kg (injection i.P. unique)	7 j	(E) 0,88 ± 0,23	DAS et NANDA 1986
	Témoin			0,18 ± 0,06	
		1 mg/kg / 3 µmol/kg	3 j	0,69 ± 0,06	
	Témoin			0,12 ± 0,07	
Ethylméthanesulfonate (EMS)					
MN	Mais	870 µg/plant / 7 µmol/plant	4 sem.	20 ^a 6	PLEWA 1984
Hydrazide maléique (HM)					
HM	Mais	11,2 µg/plant / 0,1 µmol/plant	4 sem.	100 6	PLEWA 1984
	Témoin				
		<i>T. paludosa</i>	5,6 g/l / 50 mM	24 h/48 h	Tétrades à MN % 11
	Témoin			3	

(B), cellules branchiales. (E), erythrocytes. (H), hémocytes. (N), cellules de nageoire. a: nombre de grains de pollen mutants/10⁶ grains de pollen.

Ces essais *in vitro* sont des outils de choix pour la détection d'un potentiel génotoxique dans le cadre d'essais en séries. Ils posent cependant des problèmes d'interprétation quant à la prédiction de l'impact possible des micropolluants sur l'environnement et la faune aquatique. Il est effectivement difficile d'extrapoler à des organismes supérieurs dotés de systèmes de régulation enzymatiques, hormonaux et immunologiques et exposés pendant des temps très longs aux micropolluants, les résultats obtenus sur des cellules isolées, exposées pendant des temps très courts à des fractions concentrées de ces micropolluants.

Dans un souci de meilleure représentativité, le choix de modèles eucaryotes serait préférable aux modèles bactériens, compte tenu de leur niveau d'organisation supérieur, et le choix de cellules de poissons préférable aux cellules de mammifères pour prévoir un impact en milieu aquatique. Actuellement, les lignées de cellules de poissons, – cellules RTG2 de truite arc en ciel et cellules BF2 de perche soleil – sont aussi utilisées en génotoxicité pour la détection des adduits à l'ADN des composés électrophiles, au même titre que les hépatocytes de poissons maintenus en survie *in vitro* (BABICH et BORENFREUND, 1991 ; MASFARAUD *et al.*, 1992). Il serait très utile d'avoir des mutants de ces lignées pour un caractère phénotypique donné, qui permettraient de détecter les mutations géniques et compléter ainsi la gamme des essais cytogénétiques relatifs aux mutations chromosomiques.

Mais ces systèmes cellulaires sont souvent déficients en enzymes nécessaires à la métabolisation des xénobiotiques comme celle réalisée par les monooxygénases chez les organismes supérieurs ; cette déficience peut être constitutionnelle chez les procaryotes ou acquise à la suite de la différenciation des cellules eucaryotes lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*. Ceci implique de supplémenter le milieu d'essai par des fractions enzymatiques et leurs cofacteurs, capables d'assurer l'activation métabolique des génotoxiques indirects. Ces fractions microsomiales sont généralement préparées à partir d'homogénats hépatiques de mammifères, mais peuvent aussi être obtenues à partir de poissons (SLOOF et VAN KREIJL, 1982) ou de bivalves.

Au plan de la *représentativité*, les essais *in vivo* réalisés sur vertébrés et invertébrés aquatiques sont incontestablement supérieurs aux essais sur cellules :

- les organismes supérieurs sont pourvus des systèmes de métabolisation qui participent à la détoxification des micropolluants, mais aussi à l'activation métabolique des procancérogènes ;
- ces organismes sont soumis aux contrôles hormonaux et immunologiques qui modulent considérablement les réponses cellulaires face au stress toxique ;
- leur sensibilité permet de les utiliser pour l'étude des milieux naturels, des eaux continentales et marines et celle des effluents, sans concentration préalable, ce qui constitue des conditions plus proches de la réalité environnementale.

Les essais *in vivo* exigent, par contre, de disposer de volumes importants d'échantillons. De ce fait, les extraits et concentrats dont les volumes disponibles sont généralement faibles, semblent difficilement applicables à ces essais.

Le choix d'un modèle biologique dans les essais *in vivo* sera fonction du type d'échantillon (dulçaquicole ou marin), de la facilité d'élevage des organismes, de leur disponibilité au cours de l'année, de leur sensibilité et de la facilité de détection de la génotoxicité.

Il semble que les essais micronoyaux sur l'amphibien *Pleurodeles waltl* pour les milieux dulçaquicoles et sur *Mytilus sp.* pour les milieux marins soient intéressants à retenir. A notre connaissance il n'existe pas de test équivalent sur bivalves d'eau douce.

Un développement intéressant des protocoles d'évaluation de la génotoxicité *in vivo* en laboratoire pourrait être leur application *in situ* en écoépidémiologie. L'étude des organismes prélevés au niveau de sites pollués renseignerait sur l'impact réel des contaminants sur les populations exposées et constituerait un système de contrôle *a posteriori* des effets de la pollution ; cela implique de disposer d'une zone de référence adéquate permettant de juger valablement de l'influence des contaminants.

A cet égard, la recherche des micronoyaux chez *Mytilus* est très intéressante en milieu marin. Cet organisme se prête bien aux opérations de transfert *in situ* en amont et en aval d'une source de contamination, dont il permettrait de mesurer l'impact réel. En zone fortement contaminée cependant, une sélection « naturelle » des individus les plus résistants ou « adaptés » pourrait conduire à des résultats faussement négatifs (BRUNETTI *et al.*, 1988) ; ceux-ci devront donc être interprétés avec la prudence et l'esprit critique qui convient aux études écoépidémiologiques.

6 - CONCLUSION

Cette étude bibliographique, sans être exhaustive, a permis de recenser les principaux essais *in vitro* et *in vivo* applicables à l'étude des milieux hydriques environnementaux contaminés. Elle devrait aider le chercheur dans le choix de la stratégie et des essais à mettre en œuvre, selon les objectifs fixés et les moyens disponibles.

Nous voudrions souligner en conclusion, l'intérêt d'une utilisation conjointe des essais *in vitro* et *in vivo*, mettant à profit leurs avantages respectifs pour l'étude de la mutagénicité des milieux hydriques environnementaux : les essais *in vitro* étant bien adaptés au « screening », les essais *in vivo* intéressants par leur représentativité. L'utilisation du test d'Ames, dans le cadre d'un premier dépistage des échantillons à risque, ou d'un essai de mutations chromosomiques sur lignées cellulaires, cellules CHO ou cellules de truite RTG2, associé à un essai *in vivo* tel que le test des micronoyaux sur *Pleurodeles* ou *Mytilus* semble être un bon compromis dans le cadre de l'évaluation de la génotoxicité des échantillons complexes et de la prévision des effets potentiels.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au support financier des Agences de l'Eau ; nous tenons à leur exprimer tous nos remerciements.

7 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALINK J.M., FREDERIX-WOLTERS E.M.H., VAN der GAAG M.A., VAN de KERKHOFF, POELS C.L.M., 1980. Induction of sister-chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. *Mutation Res.*, 78, 369-374.
- AI SABTI K., KURELEC B., 1985. Induction of chromosomal aberrations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Watch. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 660-665.
- ATHANASIOU K., KYRTOPOULOS S.A., 1983. Mutagenic and clastogenic effects of organic extracts from the Athenian drinking water. *Sci. Total Environ.*, 27, 113-120.
- BABICH H., BORENFREUND E., 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells : a review. *Toxic. in vitro*, 5(1), 91-100.
- BABISH J.G., JOHNSON B.E., LISK D.J., 1983. Mutagenicity of municipal sewage sludges of american cities. *Environ. Sci. Technol.*, 17, 272-277.
- BELLAR T.A., LICHTENBERG J.J., KRONER R.C., 1974. The occurrence of organohalides in chlorinated drinking water. *J. Amer. Water Works Assn.*, 66, 703-706.
- BRUNETTI R., MAJONE F., GOLA I. BELTRAME C., 1988. The micronucleus test : examples of application to marine ecology. *Mar. Ecol.*, 44, 65-68.
- COURTOIS Y., SDIKA A., MAUNOURY M., LOWY R., FESTY B., CABRIDENC R., CHOUROULINKOV I., 1986. Evaluation biologique de la micropollution organique d'eaux destinées à la consommation humaine. *J. Fr. Hydrol.*, 17 (2), 101-110.
- DAS R.K., NANDA N.K., 1986. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutation Res.*, 175, 67-71.
- DE KRUIJF H.A.M., KOOL H.J., 1985. Organic micropollutants in drinking water and health. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 507.
- DE MARINI D.M., PLEWA M.J., BROCKMAN H.E., 1982. Use of four short-term tests to evaluate the mutagenicity of municipal water. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 127-140.
- DIXON D.R. and CLARKE K.R., 1982. Sister chromatid exchange : a sensitive method for detecting damage caused by exposure to environmental mutagen in the chromosomes of adult *Mytilus edulis*. *Mar. Biol. Lett.*, 3, 163-172.
- DONNELLY K.C., BROWN K.W., KAMPBELL D., 1987. Chemical and biological characterization of hazardous industrial waste. I Prokaryotic bioassays and chemical analysis of a woodpreserving bottom-sediment waste. *Mutation Res.*, 180, 31-42.
- DOUGLAS G.R., NESTMANN E.R., LEBEL G., 1986. Contribution of chlorination to the mutagenic activity of drinking water extracts in Salmonella and Chinese Hamster ovary cells. *Environ. Health Perspect.*, 69, 81-87.
- ENGL S., PLEWA M.J., HOPKE P.K., 1988. Analysis of the genotoxicity of municipal sewage sludge extracts with sister chromatid exchange in cultured human lymphocytes. *Water, Air and Soil Pollution*, 42, 117-128.
- FABACHER, D.L., SCHMITT, C.J., BESSER, J.M., MAC, M.J., 1988. Chemical characterization and mutagenic properties of polycyclic aromatic compounds in sediment

- from tributaries of the great lakes. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7, 529-543.
- FIESSINGER F., CABRIDENC R., CHOUROULINKOV I., FESTY B., LAZAR P., RICHARD Y., 1981. Influence of prechlorination on the amount and toxicity of micropollutants extracted from water at the Morsang plant, in: *Water chlorination: Environmental impact and health effects*. JOLLEY et al. (eds), Ann Arbor Science, p 467-481.
- GRABOW W.O.K., BURGER J.S., HILNER C.A., 1981. Comparison of liquid-liquid extraction and resin adsorption for concentrating mutagens in Ames Salmonella/microsome assays on water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 27, 442-449.
- GRUENER N., LOCKWOOD M.P., 1979. Mutagenicity and transformation by recycled water. *J. Toxicol. Environ. Health*, 5, 663-670.
- HARWOOD M., BLAISE C., COUTURE P., 1989. Algal interactions with the genotoxic activity of selected chemicals and complex liquid samples. *Aquat. Toxicol.*, 14, 263-276.
- HEARTLEIN M.W., DE MARINI D.M., KATZ A.J., MEANS J.C., PLEWA M.J., BROCKMAN H.E., 1981. Mutagenicity of municipal water obtained from an agricultural area. *Environ. Mutagenesis*, 3, 519-530.
- HOLMBOM B., VOSS R.H., MORTIMER R.D., WONG A., 1984. Fractionation, isolation, and characterization of Ames mutagenic compounds in kraft chlorination effluents. *Environ. Sci. Technol.*, 18 (5), 333-337.
- HOOFTMAN R.N., 1981. The induction of chromosome aberrations in *Nothobranchius rachowi*, pisces cyprinodontidae, after treatment with ethyl methanesulphonate or benzo (a) pyrene. *Mutation Res.*, 91, 347-352.
- HOOFTMAN R.N., VINK G.J., 1981. Cytogenetic effects on the eastern mudminnow, *Umbra pygmaea*, exposed to ethyl methanesulfonate, benzo (a) pyrene and river water. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 5, 261-269.
- HORTH H., 1990. Identification of mutagens in drinking water. *J. Fr. Hydrol.*, 21 (1), 135-145.
- HOSE J.E., CROSS J.N., SMITH S.G., DIEHL D., 1987. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California. *Mar. Environ. Res.*, 22, 167-176.
- JAYLET A., GAUTIER L., FERNANDEZ M., 1987. Detection of mutagenicity in drinking water using a micronucleus test in newt larvae (*Pleurodeles waltl*). *Mutagenesis*, 2 (3), 211-214.
- JAYLET A., DEPARIS P., FERRIER V., GRINFELD S., SIBOULET R., 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutation Res.*, 164, 245-257.
- KOCAN R.M., POWELL D.B., 1985. Anaphase aberrations: an *in vitro* test for assessing the genotoxicity of individual chemicals and complex mixtures. In: *Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures IV*, M.D. WALLEN, S. SANDHU (eds.), 75-86.
- KURELEC B., CHACKO M., GUPTA R., 1988. Postlabeling analysis of carcinogen-DNA adducts in mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.*, 24, 317-320.
- KURELEC B., GARG A., KRCA S., GUPTA R., 1990. DNA adducts in marine mussel, *Mytilus galloprovincialis* living in polluted and unpolluted environments, in: *Biomarkers of Environmental Contamination*, Mc CARTHY J and SHUGART L, Eds (Lewis Publishers), 217-227.
- LECOINTE P., 1984. Induction of the SFIA SOS repair function by psoralens in the dark. *Mutation Res.*, 131, 111-113.
- MAJONE F., BRUNETTI R., GOLA I., LEVIS A.G., 1987. Persistence of micronuclei in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis* after treatment with mitomycin C. *Mutation Res.*, 191, 157-161.
- MARON D., AMES B., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- MARUOKA S., YAMANAKA S., YAMAMOTO Y., 1985. Mutagenic activity in organic concentrate from NISHITAKASE river water in KYOTO city and its fractions separated by using liquid-liquid fractionation and thin layer chromatography. *Water Res.*, 19 (2), 249-256.
- MASFARAUD J.F., DEVAUX A., PFOHL-LESZKOWICZ A., MALAVEILLE C., MONOD G., 1992. DNA adduct formation and 7-ethoxyresorufine O-deethylase

- induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to benzo(a)pyrene. *Toxicol. in vitro*, 6 (6), 523-531.
- Mc CARTHY J, JACOBSON D, SHUGART L and JIMENES B, 1989. Preexposure to 3-methylcholanthrene increases benzo(a)pyrene adducts on DNA of bluegill sunfish. *Mar. Environ. Res.*, 28, 323-328.
- NAZAR M.A., RAPSON W., 1980. Elimination of the mutagenicity of bleach plant effluents. *Pulp and Paper Canada*, 81 (8), 191-196.
- PESH C.G., PESH C.E., MALCOM A.R., 1981. *Neanthes arenaceodentata*, a cytogenetic model for marine genetic toxicology. *Aquat. toxicol.*, 1, 301-311.
- PLEWA M.J., 1984. Plant genetic assays to evaluate complex environmental mixtures, in: *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures IV*. M.D. WATERS ed. Plenum Press, New York and London, pp 45-64.
- PREIN A.E., THIE G.M., ALINK G.M., KOEMAN J.H., 1978. Cytogenetic changes in fish exposed to water of the river Rhine. *Sci. Total Environ.*, 9, 287-291.
- QUILLARDET P., HUISMAN O., D'ARI R., HOFNUNG M., 1982. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 5971-5975.
- RAM N.M., CALABRESE E.J., CHRISTMAN R.F., 1986. Organic carcinogens in drinking water: Detection, treatment and risk assessment. Wiley-Interscience, New York, pp 542.
- RANDERATH K., REDDY M.V., GUPTA R.C., 1981. ³²P-labeling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6126-6129.
- RANNUG U., JENSSEN D., RAMEL C., 1981. Mutagenic effects of effluents from chlorine bleaching pulp. *J. Toxicol. Envir. Health*, 7, 33-47.
- ROOK J.J., 1974. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *J. Soc. Treat. Exam.*, 23, 234-243.
- SCARPATO R., MIGLIORE L., ALFINITO-COGNETI G., BARALE R., 1990. Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Mar. Poll. Bull.*, 21 (2), 74-80.
- SHUGART L, Mc CARTHY J, JIMENES B, DANIELS J, 1987. Analysis of adducts formation in the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, between benzo(a)pyrene and DNA of the liver and hemoglobin of the erythrocytes. *Aquat. Toxicol.*, 9, 319-325.
- SLOOFF W., VAN KREIJL C.F., 1982. Monitoring the rivers Rhine and Meuse in the Netherlands for mutagenic activity using the Ames test in combination with rat or fish liver homogenates. *Aquat. Toxicol.*, 2, 89-98.
- VAN der GAAG M.A., 1988. Rapid detection of genotoxins in waste water: new perspectives with the sister-chromatid exchange assay *in vivo* with *Nothobranchius rachowi*. In: *Proceedings of the 1st Conference on Ecotoxicology*, Oct. 17-19 Copenhagen, 273-276.
- VAN der GAAG M.A., GAUTHIER L., NOORDSIJ A., LEVI Y., WRISBERG M.N., 1990. Methods to measure genotoxins in wastewater evaluation with *in vivo* and *in vitro* tests. In: *Genetic Toxicology of Complex Mixtures VI*, M.D. Waters (eds.), Plenum Press, New York, USA.
- VAN der HOEVEN J, BRUGGEMAN I, ALINK G. KOEMAN J., 1982. The killifish, *Nothobranchius rachowi*, a new animal in genetic toxicology. *Mutation Res.*, 97, 35-42.
- VAN HOOFF F., VERHEYDEN J., 1981. Mutagenic activity in the river Meuse in Belgium. *Sci. Total Environ.*, 20, 15-22.
- VON DER HUDE W., BEHM C., GÜRTLER R., BASLER A., 1988. Evaluation of the SOS chromotest. *Mutation Res.*, 203, 81-94.
- WEST W.R., SMITH P.A., BOOTH G.M., LEE M.L., 1988. Isolation and detection of genotoxic components in a Black River sediment. *Environ. Sci. Technol.*, 22 (2), 224-228.
- WRISBERG M.N, BILBO C, SPLIID H, 1992. Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. *Ecotoxicol. Envir. Safety*, 23, 191-205.
- WRISBERG M.N., Van der GAAG M.A., 1992. *In vivo* detection of genotoxicity in waste water from a wheat and rye straw paper pulp factory. *Sci. Total Envir.*, 121, 95-108.
- XU H., DUTKA B.J., KWAN K.K., 1987. Genotoxicity studies on sediments using a modified SOS chromotest. *Tox. Assessment*, 2, 79-87.